



TITLE:

Studies on Psychrotolerant Endospore-forming Bacteria for Developing Food Preservation Methods(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Tsuda, Kentaro

CITATION:

Tsuda, Kentaro. Studies on Psychrotolerant Endospore-forming Bacteria for Developing Food Preservation Methods. 京都大学, 2016, 博士(農学)

ISSUE DATE:

2016-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k19779>

RIGHT:

許諾条件により本文は2017-03-22に公開

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	津田謙太郎
論文題目	Studies on Psychrotolerant Endospore-forming Bacteria for Developing Food Preservation Methods （食品保存技術の開発に向けた低温耐性芽胞菌に関する研究）		
（論文内容の要旨）			
<p>利便性の高い加工食品を安全かつ安定的に供給する為には、腐敗の原因となる微生物の増殖を抑制し、品質を保つ必要がある。加熱処理後、冷蔵保存される加工食品では、低温耐性芽胞菌が腐敗を引き起こす主要因となる。これまで、低温耐性芽胞菌が牛乳や卵から分離された例はあるが、日本での消費量が多い蒲鉾や竹輪などの原料となる魚肉すり身を主たる対象とした研究例は少なく、それらの制御技術も十分に確立されていない。</p> <p>本研究は、魚肉すり身から低温耐性芽胞菌を分離し、<i>Sporosarcina</i>属細菌と同定した初めての例である。これまで、加工食品原料としての魚肉すり身から<i>Sporosarcina</i>属細菌が分離された報告はなく、食品の腐敗の原因としては注目されていなかった。そのため、本菌に対する制御技術は未だ確立されていない。そこで、本研究では、魚肉すり身を原料とした加工食品の品質向上を目的として、<i>Sporosarcina</i>属細菌の低温耐性メカニズムに着目した増殖制御技術について検討した。また、魚肉すり身から分離した<i>Sporosarcina</i>属細菌に対して、増殖抑制活性を示す化合物を探索した。</p> <p>第一章では、魚肉すり身加工過程における微生物叢とその動態の解析、および低温耐性芽胞菌の同定を行った。魚肉すり身から微生物を分離し、16S rRNA遺伝子の塩基配列を解析して、菌種の同定を行った。非加熱状態の魚肉すり身から検出された菌数（colony-forming unit、CFU）は、いずれもサンプル10 g当り$10^5 \sim 10^7$ CFUであり、非芽胞菌が主要な菌株として観察された。魚肉すり身を80℃で90秒加熱すると、検出菌数は10 CFU未満に減少したが、引き続き5℃で2週間、または10℃で1～2週間保存すると$10^2 \sim 10^5$ CFUまで増加した。その際の微生物叢からの分離株は、すべてBacillales目の芽胞菌であった。これらの分離菌の中でも、<i>Sporosarcina</i>属細菌はその他の芽胞菌よりも10℃での生育速度が速かった。また、<i>Sporosarcina</i>属細菌の芽胞は通常の竹輪や蒲鉾などの加熱条件に十分耐えうる高い耐熱性を示した。よって、原料の一部として魚肉すり身を用いている食品で、加熱された後、冷蔵保存される蒲鉾や竹輪などでは、低温耐性芽胞菌である<i>Sporosarcina</i>属細菌が腐敗を引き起こす一因となりうることを示した。</p> <p>第二章では、<i>Sporosarcina</i>属細菌の低温耐性メカニズムに関して、脂肪酸組成の観点から解析し、脂肪酸の生合成経路を考慮した生育制御技術の確立を検討した。</p> <p>魚肉すり身から分離した<i>Sporosarcina</i> sp. S92h株、およびその近縁種である<i>Sporosarcina koreensis</i> は、分岐鎖脂肪酸であるアンテイソ脂肪酸およびイソ脂肪酸を主要構成成分とする脂肪酸組成を示した。また、低温生育時（7～13℃）においては、アンテイソ脂肪酸（anteiso-$C_{15:0}$）ならびに不飽和脂肪酸（n-$C_{16:1}$、iso-$C_{16:1}$、</p>			

iso-C_{17:1}、および*anteiso-C_{17:1}*）の割合が増加した。アンテイス脂肪酸は、同じ炭素数のイソ脂肪酸および直鎖脂肪酸よりも融点が低く、一方、不飽和脂肪酸は、同じ炭素数の飽和脂肪酸よりも融点が低いことが知られていることから、*Sporosarcina*属細菌は、低温生育時に*anteiso-C_{15:0}*および不飽和脂肪酸の割合を増やし、細胞膜の流動性を維持することによって、低温耐性を獲得していることを明らかにした。したがって、脂肪酸組成の変化が低温耐性に重要であり、加工食品中の*Sporosarcina*属細菌の脂肪酸組成を制御することにより、本菌の低温での増殖を抑制できる可能性が示された。

次に、分岐鎖脂肪酸が分岐鎖アミノ酸（バリン、ロイシン、およびイソロイシン）から生成される生合成経路が*Bacillus*属細菌などで報告されていることから、*Sporosarcina*属細菌に分岐鎖アミノ酸を与えることによって、脂肪酸組成を変化させ、低温下での生育に影響を及ぼすことができるかを検討した。分岐鎖アミノ酸を添加した培地で培養した*Sporosarcina*属細菌の脂肪酸組成を分析した結果、バリン、ロイシン、およびイソロイシンを添加した場合、それぞれ炭素数が偶数のイソ脂肪酸、奇数のイソ脂肪酸、および奇数のアンテイス脂肪酸の割合が増加しており、*Sporosarcina*属細菌においても、*Bacillus*属細菌と同様の生合成経路が保持されていることが示唆された。ロイシンを70 mM添加した培地を用いて、*Sporosarcina* sp. S92h株を7℃にて培養した場合、添加しない場合よりも*anteiso-C_{15:0}*の割合が減少し、低温下での生育が抑制された。一方、イソロイシンを50 mM添加した培地を用いて、*S. koreensis*を13℃にて培養した場合、添加していない場合よりも*anteiso-C_{15:0}*の割合が増加し、低温下での生育が促進された。以上のことから、分岐鎖アミノ酸の添加によって、*Sporosarcina*属細菌の低温耐性に寄与する*anteiso-C_{15:0}*の割合を調節し、低温での増殖を制御しうることを示した。

第三章では、*Sporosarcina*属細菌の細胞膜の脂肪酸組成が生育に影響を及ぼしていることから、油脂類等の疎水性化合物が*Sporosarcina*属細菌の生育に及ぼす影響を評価した。遊離脂肪酸、モノアシルグリセロール、トリアシルグリセロール、および没食子酸アルキルによる*Sporosarcina* sp. S92h株の生育に対する影響について評価した結果、遊離のオレイン酸、リノール酸、およびα-リノレン酸、ならびに没食子酸オクチルおよび没食子酸ラウリルを200 μM添加した培地（Tryptic Soy Broth）において、顕著に増殖が抑制された。すなわち、これらの化合物の利用により、*Sporosarcina*属細菌の増殖を抑制することで、加工食品の腐敗を防止できる可能性が明らかになった。また、評価した疎水性化合物の分子量およびACD/LogP（構造から予測した*n*-オクタノール/水の分配係数）と増殖抑制活性の関係について調べた結果、本菌に対する増殖抑制活性を示す疎水性化合物の分布は、分子量が300付近、かつACD/LogPが4.40～7.70付近に収束する傾向があることを示した。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(論文審査の結果の要旨)

蒲鉾や竹輪などの原料となる魚肉すり身を主たる対象とした低温耐性芽胞菌に関する研究例は少なく、加工食品における低温耐性芽胞菌の増殖制御技術が求められていた。本論文は、魚肉すり身に存在する低温耐性芽胞菌を特定し、加工食品における本菌の増殖抑制技術の開発を試みたものであり、評価すべき点は以下の4点である。

1. *Sporosarcina* 属細菌が、竹輪や蒲鉾など、加熱され冷蔵流通される加工食品において増殖可能な微生物として存在することを示し、腐敗を引き起こす一因となりうることを示した。
2. *Sporosarcina* 属細菌では、アンテイソ脂肪酸 (*anteiso*-C_{15:0}) ならびに不飽和脂肪酸 (*n*-C_{16:1}、*iso*-C_{16:1}、*iso*-C_{17:1}、および *anteiso*-C_{17:1}) の菌体全脂肪酸における割合の増加が、低温での生育に重要な役割を果たしていることを明らかにした。
3. 分岐鎖脂肪酸の前駆体となる分岐鎖アミノ酸の培地への添加が、*Sporosarcina* 属細菌の脂肪酸組成に変化を与え、本菌の低温下での生育に影響を及ぼすことを明らかにした。特に、イソ脂肪酸の前駆体となるロイシンの培地への添加が、菌体全脂肪酸におけるアンテイソ脂肪酸の割合を減じ、本菌の低温での生育を抑制することを明らかにした。
4. *Sporosarcina* 属細菌に対して増殖抑制活性を示す遊離脂肪酸や没食子酸アルキルを見いだした。*Sporosarcina* 属菌に対する増殖抑制活性を示す疎水性化合物の分布は、分子量が 300 付近、かつ ACD/LogP が 4.40~7.70 付近に収束する傾向を示した。これらの化合物の利用により、加工食品における *Sporosarcina* 属細菌の増殖を抑制できる可能性を示した。

以上のように、本論文は、蒲鉾や竹輪などの魚肉すり身を原料とした加工食品の品質維持を目指し、魚肉すり身に存在する低温耐性芽胞菌を特定し、その低温耐性メカニズムの一端を明らかにした。さらに、そのメカニズムに着目した増殖制御技術を検討し、本菌に対して増殖抑制活性を示す化合物を見いだしたものであり、発酵生理学、応用微生物学、応用生化学に寄与するところが多い。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成28年2月4日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することと支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降（学位授与日から3ヶ月以内）